

## АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)  
по специальности 6D060700 – Биология

Рамазанова Алибека Кайриденовича

### **Криогенное хранение и разработка методов краткосрочного и долгосрочного хранения семян сортов *Chamomilla recutita***

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа посвящена изучению условий криоконсервации семенного материала сортов *Chamomilla recutita* и разработка алгоритмов долгосрочного и краткосрочного хранения.

**Актуальность темы.** Наиболее ценным и незаменимым природным ресурсом являются растения, особенно лекарственные, которые имеют широкое применение, как в официальной медицине, так и в народной. В современной медицине в настоящее время уделяется особое внимание лекарственным средствам, изготавливаемым из различных видов лекарственных растений. Высокий интерес к лекарственным растениям объясняется их высокой фармакологической активностью. Препараты на основе лекарственных трав легко усваиваются, не кумулируются и легко выводятся из организма, практически не имеют токсического воздействия, по сравнению с препаратами синтетического характера.

Развитие производства лекарственного сырья актуально в Казахстане в свете обеспечения местным сырьем фармацевтической отрасли.

Во флоре республики растет около 6000 видов сосудистых растений, четверть которых проявляет лекарственные свойства. В ГФ РК внесено 132 таксона, однако, порядка 30% не встречаются в местной флоре. Следует отметить, что в Казахстане по нескольким видам лекарственных растений имеются небольшие запасы, но для полного обеспечения сырьем их недостаточно.

В лекарственном растениеводстве одним из важных направлений является семеноводство и создание устойчивых запасов семян растений. Всем известно, что семена большинства лекарственных растений быстро теряют свою всхожесть в течение 2-5 лет и хранятся ограниченное время. Традиционные способы сохранения семян при температуре от 0-+5 до -15°C не полностью способны сохранить полноценную жизнеспособность в течение длительного периода. Так как в процессе хранения происходят физические и физиологические изменения (потеря влаги, поражение грибами, бактериями, вредителями, накопление продуктов распада и т.д.). Поэтому применение хранения при температуре сжиженного азота (-196°C) оказывается более перспективным направлением для семеноводства лекарственных растений и сохранения их генетических ресурсов.

Криогенное хранение позволяет хранить семенной материал растений длительный период, причем, не только с сохранением жизненных процессов, но и с повышением жизнеспособности. В перспективе семена могут храниться неограниченное по срокам время.

В Казахстане метод сохранения семян лекарственных культур в жидком азоте мало апробирован, в основном исследования направлены на замораживание меристем, пыльцевых зерен, почек, черенков и др.

Как было отмечено ранее, что процесс криоконсервации семян изучается продолжительное время, но применение данного метода протестировано на небольшом числе лекарственных культур, поэтому перед нами была поставлена задача определить условия криоконсервации семенного материала сортов *Chamomilla recutita* и разработать алгоритм долгосрочного и краткосрочного хранения.

Таким образом, выполнение научных исследований по разработке основ краткосрочного и долгосрочного хранения семян *Chamomilla recutita* при помощи методов криоконсервации является на данный момент важным и актуальным направлением.

**Цель исследования:** изучение влияния сверхнизких температур на семенной материал сортов *Chamomilla recutita* и разработка методов долгосрочного и краткосрочного хранения.

**Задачи исследования:**

1. Определение жизнеспособности семян в зависимости от сроков хранения и изучение морфометрических и анатомических показателей семенного материала сортов ромашки аптечной до и после замораживания в жидком азоте
2. Оптимизация условий замораживания и размораживания семенного материала сортов ромашки аптечной после криоконсервации;
3. Изучение влияния физических факторов на жизнеспособность семенного материала сортов ромашки аптечной и подбор оптимальных концентраций протекторов при криохранении.
4. Определение количественного накопления эфирных масел ромашки аптечной сортов «Карагандинская» и «Подмосковная» после криогенного хранения
5. Разработка алгоритмов криозамораживания семян сортов ромашки аптечной.

**Объекты исследования** являются семена ромашки аптечной сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь». Семена были собраны в питомнике Международного научно-производственного центра «Фитохимия», а также получены по делектусу из Алтайского ботанического сада.

**Методы исследования:** оценка семенной всхожести и биологии прорастания, криоконсервирование семян путем прямого погружения в сосуды Дюара с жидким азотом, использование двух методов размораживания (быстрое и медленное размораживание), анатомическое изучение строения семян и

проростков методом давленных препаратов, использование сканирующего электронного микроскопа (СЭМ микроскопия), определение количественного накопления эфирного масла методом водной дистилляции. С помощью программного обеспечения Microsoft Excel и среды RStudio проводилась статистическая обработка и графическая визуализация полученных данных.

#### **Научная новизна исследования:**

1. Впервые исследованы жизнеспособность семян 4-х сортов ромашки аптечной в зависимости от условий криоконсервации, исследованы анатомо-морфометрические показатели проростков;

2. Впервые выявлено действие криопротекторов на всхожесть и энергию прорастания семян сортов ромашки аптечной, что позволило подобрать оптимальные виды и концентрации криопротекторов.

3. Впервые изучено влияние предпосевных методов обработки семенного материала сортов ромашки аптечной с использованием физических факторов.

4. Впервые выявлено количественное накопление эфирного масла в надземных органах двух сортов ромашки аптечной, его компонентный состав после хранения семян в жидком азоте.

**Теоретическая и практическая значимость результатов.** Исследование условий криоконсервации семян сортов ромашки аптечной показало, что оптимальной тарой при криозамораживании являются пластиковые криопробирки.

Определено, что при криоконсервации семян ромашки аптечной следует использовать метод медленного размораживания.

В качестве криопротекторов рекомендовано использовать раствор PVS2, высококонцентрированную сахарозу, глюкозу, фруктозу и ДМСО, также низкоконцентрированный пропиленгликоль.

Определено, что после воздействия сверхнизких температур анатомо-морфологическое строение семян и проростков всех 4-х сортов ромашки аптечной не изменяется.

Доказано, что при длительном криогенном хранении семян ромашки аптечной всхожесть 3-х сортов повышается.

Выявлено, что после криогенного хранения предпосевная обработка семян физическими факторами активации повышает всхожесть и энергию прорастания исследуемых сортов.

Установлено, что повышается содержание эфирного масла и отдельных компонентов в траве ромашки аптечной сортов «Карагандинская» и «Подмосковная» после криоконсервации семян

Разработанный алгоритм криоконсервации и методические рекомендации позволили внедрить семена ромашки аптечной 4-х сортов в криогенный банк лекарственных растений исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга БГФ КарУ им. Е.А. Букетова».

Результаты научных исследований внедрены в практическую деятельность и учебный процесс.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Хранение семенного материала ромашки аптечной традиционным методом в течение 3-х лет снижает лабораторную всхожесть.

2. Оптимизация условий замораживания семян ромашки аптечной показала, что такие сорта, как Айболит, Карагандинская и Старый лекарь положительно отреагировали на длительное хранение в жидком азоте. Для семян сорта Подмосковная лучше использовать краткосрочное криоконсервирование. При оптимизации условий размораживания семян было выявлено, что для сортов «Подмосковная», «Айболит» и «Карагандинская» наиболее подходящим методом оттаивания является медленная разморозка, а для сорта «Старый лекарь» быстрая.

3. При сверхнизком замораживании семян ромашки аптечной для предотвращения образования внутри клеток повреждающих кристаллов льда необходимо использовать высококонцентрированные криопротекторы такие, как сахароза, глюкоза, фруктоза, ДМСО и низкоконцентрированный пропиленгликоль, а также криопротекторный раствор PVS2.

4. Сверхнизкая температура повышает количественное накопление эфирных масел в надземной части ромашки аптечной.

**Основные результаты:**

1. Установлено, что при хранении семян сортов *Chamomilla recutita* традиционным методом в течение 3-х лет наблюдается снижение лабораторной всхожести, особенно у сортов «Старый лекарь» и «Подмосковная». Сканирующая электронная микроскопия, анатомия семян и проростков показали, что после криоконсервации оболочки семян исследуемых сортов «Карагандинская», «Подмосковная», «Айболит» и «Старый лекарь», не повреждаются, значительные морфологические изменения в структуре поверхности семенной кожуры не наблюдаются, целостность семян сохраняется. Также не наблюдается изменений в анатомических структурах семян и проростков (семядольные листья, гипокотиль, кончик корня) после криохранения исследуемых сортов *Chamomilla recutita*.

2. Определение условий замораживания семян сортов *Chamomilla recutita* показала, что сорта «Карагандинская», «Айболит» и «Старый лекарь» положительно отреагировали на долгосрочное хранение в жидком азоте (6 месяцев). При криохранении семян сорта Подмосковная рекомендуется использовать краткосрочное сверхглубокое замораживание. Оптимальным режимом оттаивания после криоконсервации является медленное размораживание при комнатной температуре для сортов «Карагандинская», «Айболит» и «Подмосковная»; для сорта «Старый лекарь» рекомендуется использовать быструю разморозку на водяной бане при температуре +40°C.

3. При изучении влияния физических факторов на жизнеспособность семян *Chamomilla recutita* после криоконсервации было выявлено положительное стимулирующее действие барботирования и магнитного поля на сорта «Карагандинская» и «Айболит». Для сортов «Подмосковная» и «Старый лекарь» физические факторы активации оказались неэффективными. Подбор оптимальных концентраций и видов криопротекторов показал, что наиболее эффективными для всех сортов, кроме сорта «Айболит», являются: из непроникающих криопротекторов - глюкоза (40%), сахароза (40%) и фруктоза (20%, 25%); из проникающих - высококонцентрированный 15%-ый ДМСО и пропиленгликоль (5%, 10%). Также в качестве криопротектора положительное действие оказал раствор PVS2 при криогенном хранении семян сортов «Подмосковная» и «Карагандинская».

4. Обнаружено положительное действие сверхнизких температур на химический состав и количественное накопление эфирного масла в надземной части *Chamomilla recutita*. Так, в растении, выращенной из криоконсервированных семян повышается накопление эфирного масла и увеличивается процентное содержание компонентов сесквитерпенового класса и веществ эфирной группы.

5. По итогам проведенных исследований разработан алгоритм криозамораживания семенного материала 4-х сортов *Chamomilla recutita*.

#### **Внедрение результатов работы.**

Результаты исследований внедрены в учебный процесс биолого-географического факультета НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова» по дисциплинам ботаника и криобиология, в деятельность исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга для выполнения работ по криобиологии, а также внедрены в научный процесс для организации работы семенного банка растений Алтайского ботанического сада.

#### **Связь данной работы с научно-исследовательскими проектами.**

Диссертационная работа выполнена в рамках реализации грантового проекта Комитета науки МОН РК № AP09259548 «Криоконсервация семенного материала дикорастущих и лекарственных растений и организация банка краткосрочного и долгосрочного хранения» (2021-2023 гг.).

#### **Личный вклад автора.**

Автором лично разработана программа диссертационного исследования, проведена экспериментальная часть работы, выполнены исследования по криоконсервации семенного материала. Автор лично занимался сбором исходных данных, проведением статистической обработки и анализом полученных результатов. Были сформулированы основные положения, выводы, написаны основные разделы диссертационного исследования. Самостоятельно подготовлены и опубликованы научные статьи. Личный вклад автора составил 90%.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация включает введение, 6 основных раздела, заключение, список использованных источников и приложения. Объем диссертации составляет 151 страница, работа проиллюстрирована 52 рисунками, 10 таблицами. Список использованных источников включает 235.

#### **Апробация работы.**

Итоги диссертационного исследования были обсуждены и доложены на международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Караганда, 16-17 ноября 2018 г.); Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 120-летию Н.В. Цицина «Наследие академика Н.В. Цицина. Современное состояние и перспективы развития» (Москва, 8-11 июля 2019 г.); VI Всероссийской конференции с международным участием «ЭкоБиоТех 2019» (Уфа, 1-4 октября 2019 г.); V международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Методология, теория и практика современной биологии» (Костанай, 13 марта 2020 г.); международной научно-практической конференции «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям» (Полтава, 29-30 июня 2020 г.); международной научной конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2021, 16-17 декабря); XV международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии» (Караганда, 20-21 января 2023 г.), Республиканской научно-практической конференции (с международным участием), приуроченной к 80-летию юбилею ученого-педагога, профессора кафедры ботаники Ахметжановой Айтбалы Ибжановны «Актуальные проблемы биологии и экологии». Результаты диссертационного исследования опубликованы в научном журнале, входящем в наукометрическую базу Scopus «Research on Crops», в журналах, рекомендованных КОКСОНВО РК – «Bulletin of the Karaganda University, series biology». Выпущена в печать монография по криоконсервации семенного материала лекарственных растений и разработаны практические рекомендации.